pGEM®-T 和
pGEM®-T Easy 载体系统

原英文技术手册号码：**TM042**

产品 A1360，A1380，A3600 和 A3610 的操作指南。
所有技术资料均可在www.promega.com网站上得到，
请访问公司网站以证实您所使用的技术手册为最新版本

I. 描述 **2**

II. 载体图谱 **3**

III. 产品组分 **6**

IV. 采用 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体和 2×快速连接缓冲液进行连接 **7**

A. 操作步骤 **7**

V. 采用 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体的连接反应产物的转化 **7**

VI. 注意事项 **8**

A. PCR 产物纯度 **8**

B. 平端 PCR 产物 **9**

C. 优化插入片段与载体的摩尔比 **10**

D. 有插入片段的转化子的筛选 **11**

E. 实验对照 **11**

VII. 重组质粒 DNA 的提取 **12**

VIII. pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体单链 DNA 的制备 **12**

IX. 疑难解答 **13**

X. 参考文献 **15**

XI. 附录 A：载体序列及限制性酶切位点 **16**

A. pGEM®-T 载体序列 **16**

B. pGEM®-T 载体限制性酶切位点 **17**

C. pGEM®-T Easy 载体序列 **18**

D. pGEM®-T Easy 载体限制性酶切位点 **19**

XII. 附录 B：参考资料 **21**

A. 缓冲液及溶液配方 **21**

B. 相关产品 **22**

I. 描述

pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体系统可用于 PCR 产物的克隆。这两种载体是通过 EcoRⅤ酶切 pGEM®-5Zf(+)和 pGEM®-T Easy 载体，并在 3'末端加入胸腺嘧啶构建的。插入位点 3'-T 突出端可提高 PCR 产物的连接效率，因为 3'-T 突出端可以防止载体的自身环化，并且为热稳定性聚合酶（1，2）产生 PCR 产物提供一个匹配碱基。如表 1 总结的，这些聚合酶常常以不依赖模板方式在扩增产物的 3'端加上一个脱氧腺苷酸（3，4）。

pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 高拷贝数载体包含有 T7 和 SP6 RNA 聚合酶启动子，其侧翼和多克隆位点区相接，多克隆位点区位于 β 半乳糖苷酶的 α 肽编码区内。α 肽插入失活允许在指示培养基用颜色直接筛选重组克隆。另外这两个载体的多克隆位点区的限制性酶切位点适用于采用 Promega 公司 Erase-a-Base®系统（产品目录号#E5750）产生一系列巢式缺失体。

pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体的多克隆位点区含有一些这样的限制性酶切位点，采用这些酶进行单酶切消化即可释放插入片段。如 pGEM®-T Easy 载体多克隆区的 EcoRⅠ、BstZⅠ和 NotⅠ酶切位点。而 pGEM®-T 载体多克隆区只有一种这样的酶切位点 BstZⅠ。这两种载体也可选用适当的双酶切消化释放插入片段。

pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体含有丝状噬菌体 f1 复制起始子，可用于制备单链 DNA (ssDNA 参见第Ⅶ部分)。单链 DNA 分子对应于图 1 底部一条链，图一中上图代表 pGEM®-T 载体，下图代表 pGEM®-T Easy 载体。

pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体系统包含 2×快速连接缓冲液，用于连接 PCR 产物。采用这种缓冲液进行连接，在室温孵育 1 小时即可完成。延长孵育时间可增加转化克隆菌数目。一般 4℃过夜连接可产生最多的转化子。

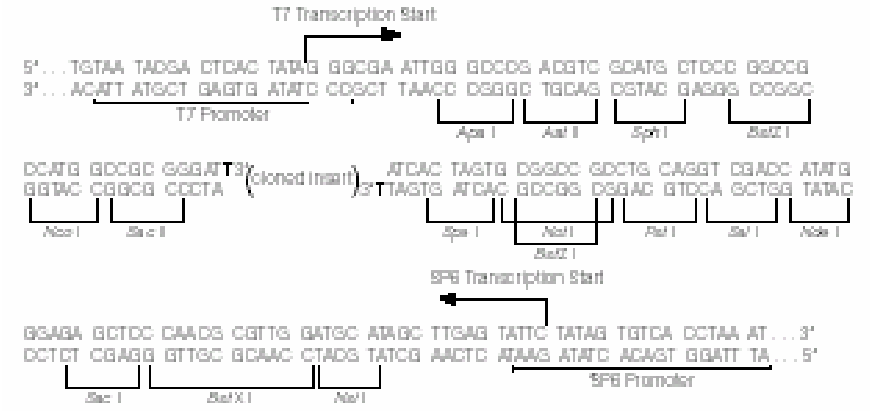
表 **1.** 部分热稳定性 **DNA** 聚合酶所产生的 **PCR** 产物特性的比较。

特性	热稳定性 DNA 聚合酶 ***Taq*/ AmpliTaq®**	***Tfl***	**Tth**	**Vent®/ (*Tli*)**	**Deep Vent®**	**Pfu**	**Pwo**
PCR 产物末端	3'A	3'A	3'A	>95% 平端	>95% 平端	平端	平端
5'-3'外切酶活力	有	有	有	无	无	无	无
3'-5'外切酶活力	无	无	无	有	有	有	有

II. 载体图谱

A. pGEM®-T 载体和 pGEM®-T Easy 载体多克隆位点序列

pGEM®-T 载体



pGEM®-T Easy Vector

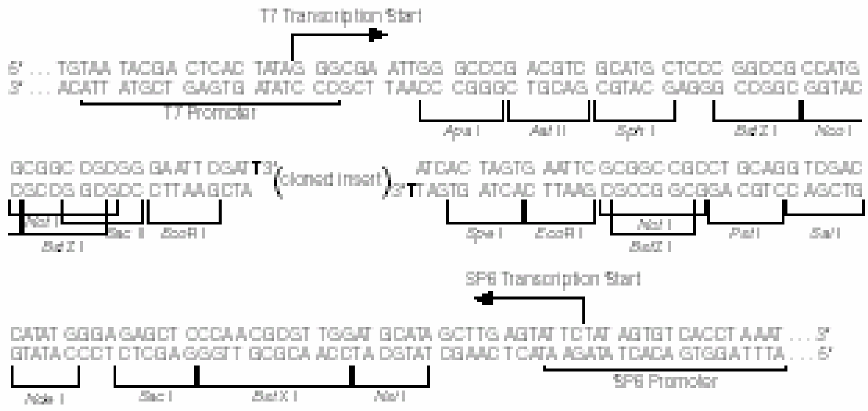


图 1. pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体的启动子及多克隆位点区序列 。上部序列链对应于用 T7 RNA 聚合酶合成的 RNA 序列，底部序列链对应于用 SP6 RNA 聚合酶合成的 RNA 序列。

注意：用 BstZ I (Cat.# R6881) 单酶切可释放插入 pGEM®-T 载体的 DNA 片段。

注意：用 BstZ I (Cat.# R6881), EcoR I (Cat.# R6o11)或 Not I (Cat.# R6431) 进行单酶切可释放插入 pGEM®-TEasy 载体的 DNA 片段。

Promega
Precision Design… for Life
www•promega•com

B. pGEM®-T 载体图和相关序列位点

可使用 SP6 Promoter Primer (Cat.# Q5011), T7 Promoter Primer (Cat.# Q5021), pUC/M13 Forward Primer （Cat.# Q5601）, 或 pUC/M13 Reverse Primer （Cat.# Q5421）对插入的 DNA 片段进行测序。

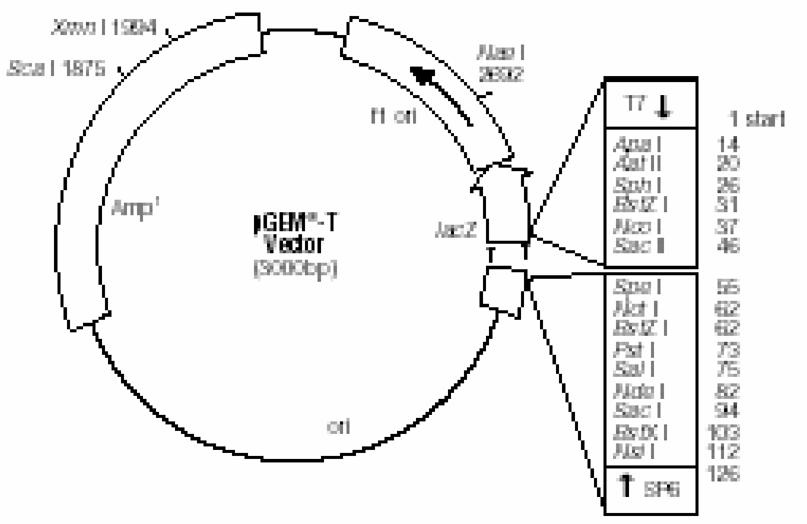


图 2. pGEM®-T 载体环形图谱及相关的序列位点

注意：用 BstZ I (Cat.# R6881)单酶切可释放插入 pGEM®-T 载体的 DNA 片段。双酶切也可用于释放插入 pGEM®-T 载体的 DNA 片段。

pGEM®-T 载体相关的序列位点

T7 RNA 聚合酶转录起始位点	1
多克隆位点区	10－113
SP6 RNA 聚合酶启动子（－17 至＋3）	124－143
SP6 RNA 聚合酶转录起始位点	126
pUC/M13 反向测序引物结合位点	161－177
lacZ 起始密码子	165
lac 操纵子	185－201
β 内酰胺酶编码区	1322－2182
噬菌体 f1 区	2365－2820
lac 操作子序列	2821－2981，151－380
pUC/M13 正向测序引物结合位点	2941－2957
T7 RNA 聚合酶启动子（－17 至＋3）	2984－3

C. pGEM®-T Easy 载体图和相关序列位点

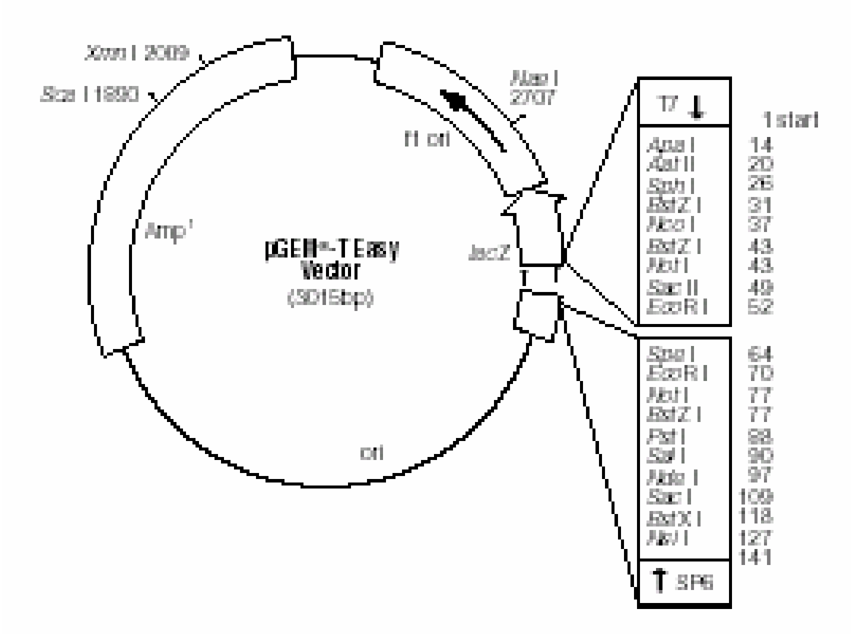


图 3. **pGEM®-T Easy** 载体环形图谱及相关的序列位点

pGEM®-T Easy 载体相关的序列位点

T7 RNA 聚合酶转录起始位点	1
多克隆位点区	10－128
SP6 RNA 聚合酶启动子（－17 至＋3）	139－158
SP6 RNA 聚合酶转录起始位点	141
pUC/M13 反向测序引物结合位点	176－197
lacZ 起始密码子	180
lac 操纵子	200－216
β 内酰胺酶编码区	1337－2197
噬菌体 f1 区	2380－2835
lac 操作子序列	2836－2996, 166－395
pUC/M13 正向测序引物结合位点	2956－2972
T7 RNA 聚合酶启动子（－17 至＋3）	2999－3

pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体的特殊应用

1. PCR 产物的克隆。
2. 采用 Erase-a-Base®系统构建不定向巢式缺失体。
3. 单链 DNA 制备。
4. 重组子的蓝白斑筛选。
5. 利用双向启动子进行体外转录。（操作步骤详见 Promega 公司 *Riboprobe*®体外转录技术手册＃TM016）。

Precision Design… *for Life*
www•promega•com

可使用 SP6 Promoter Primer (Cat.# Q5011), T7 Promoter Primer (Cat.# Q5021), pUC/M13 Forward Primer（Cat.# Q5601）, 或 pUC/M13 Reverse Primer（Cat.# Q5421）对插入的 DNA 片段进行测序。

注意：用 BstZ I (Cat.# R6881) 单酶切可释放插入 pGEM®-T 载体的 DNA 片段。双酶切也可用于释放插入 pGEM®-T 载体的 DNA 片段。

III. 产品组成

产品	包装	目录号
pGEM®-T 载体系统 I	20 个反应	A3600

包括：

1.2μg	pGEM®-T 载体(50ng/μl)
12μl	插入 DNA 对照（4ng/μl）
100 U	T_4 DNA 连接酶
200μl	T_4 DNA 连接酶的 2×快速连接缓冲液
1	操作手册

产品	包装	目录号
pGEM®-T 载体系统 II	20 个反应	A3610

包括：

1.2μg	pGEM®-T 载体(50ng/μl)
12μl	插入 DNA 对照（4ng/μl）
100 U	T_4 DNA 连接酶
200μl	T_4 DNA 连接酶的 2×快速连接缓冲液
1.2ml	JM109 高效率感受态细胞（6×200μl）
1	操作手册

产品	包装	目录号
pGEM®-T Easy 载体系统 I	20 个反应	A1360

包括：

1.2μg	pGEM®-T Easy 载体(50ng/μl)
12μl	插入 DNA 对照（4ng/μl）
100 U	T_4 DNA 连接酶
200μl	T_4 DNA 连接酶的 2×快速连接缓冲液
1	操作手册

产品	包装	目录号
pGEM®-T Easy 载体系统 II	20 个反应	A1380

包括：

1.2μg	pGEM®-T Easy 载体(50ng/μl)
12μl	插入 DNA 对照（4ng/μl）
100 U	T_4 DNA 连接酶
200μl	T_4 DNA 连接酶的 2×快速连接缓冲液
1.2ml	JM109 高效率感受态细胞（6×200μl）
1	操作手册

贮存条件：产品 A1360 和 A1380 中的感受态细胞保存在－70℃。所有其它组份可以保存在－20℃或－70℃。

IV. 采用 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体以及 2×快速连接缓冲液进行连接反应的步骤

1. 短暂离心 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体及 DNA 插入对照管，使内容物汇集到管底。
2. 按以下方法建立连接反应。注意使用低 DNA 结合力的 0.5ml 离心管（如 VWR 目录号 20170－310）
3. 每次使用 2 ×快速连接缓冲液时要充分混匀。

	标准反应	阳性对照	背景对照
T_4 DNA 连接酶的 2×快速连接缓冲液	5μl	5μl	5μl
pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体(50ng)	1μl	1μl	1μl
PCR 产物	Xμl*	—	—
插入 DNA 对照	—	2μl	—
T_4 DNA 连接酶（3 Weiss 单位/μl）	1μl	1μl	1μl
补加去离子水至终体积	10μl	10μl	10μl

* PCR 产物:载体的摩尔比可能需要进行优化（见章节 VI.C）

4. 用移液器吹打连接反应使之混匀后，室温孵育 1 小时。
5. 如果需要得到最大数目的转化菌落，可选择 4℃孵育过夜。

注意：

1. 在使用 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体连接时只能使用本系统提供的 Promega 公司 T_4 DNA 连接酶。其他商用的 T_4 DNA 连接酶可能具有外切酶活力，造成载体的末端胸腺嘧啶被除去。
2. 2 ×快速连接缓冲液含有 ATP，在温度波动时 ATP 易降解。可将缓冲液分装成一次用量的小管，这样可避免反复冻融及经常的温度变化。
3. 在每次使用 2 ×快速连接缓冲液时一定要用混悬器混匀。
4. 长孵育时间可增加转化子的数目，一般 4℃孵育过夜可得到更多的转化子。

V. pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体连接反应产物的转化步骤

一定要使用高效率的感受态细胞（1×10^8 cfu/μg DNA）进行转化，因为采用单碱基突出端进行连接不是很有效，采用转化效率高的感受态细胞 1×10^8 cfu/μg DNA（或更高）可得到合理的克隆菌数目（参见章节 VI. E）。

我们建议使用 JM109 高效感受态细胞（产品目录号：L2001），pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体系统Ⅱ提供这种感受态细胞。也可使用其他宿主菌，但是它们应该适合用蓝白斑及氨苄进行筛选。

制备感受态细胞所用的 JM109 应保存在含加维生素 B1 的 M9 基本培养基中

在使用 JM109 制备感受态细胞前，JM109 应保存在含加维生素 B1 的 M9 基本培养基中，这有助于 F'因子的选择，F'因子带有 proAB 基因，这和脯氨酸营养缺陷型宿主菌（proAB 基因缺失）是互补的，携带的 lacIqZ∆M15 对于蓝白斑筛选是必需的。如果你不采用 Promega 公司 JM109 高效率感受态细胞，应按照后面的转化步骤进行操作。在 LB/氨苄/IPTG/X-Gal 平板筛选转化子（参见章节 XI. A），为得到理想的结果，最好不要使用放置超过 1 个月的平板。

JM109 的基因型是：recA1，endA1，gyrA96，thi，hsdR17 (rK–,mK+)，relA1，supE44，△(lac-proAB), [F´, traD36, proAB, lacIqZ△M15] (5).

Promega
Precision Design… for Life
www•promega•com

操作者需准备的材料（溶液配制参见章节 **XII. A**）

- LB 平板（含有氨苄/IPTG/X-Gal）
- SOC 培养基

在第 3 步，避免反复吹打，因感受态细胞特别脆弱。

1. 每个连接反应准备 2 个 LB/氨苄/IPTG/X-Gal 平板，附加 2 个平板测定转化效率（见章节 VI.E），涂板前将平板平衡至室温（步骤 10）。
2. 离心使连接反应内容物汇集到管底，取 2μl 连接反应产物加到置于冰上的 1.5ml 离心管中（见注意事项 1），向另一置于冰上的 1.5ml 离心管加入 0.1ng 未酶切的质粒以测定感受态细胞的连接效率。（见章节 VI.E）
3. 将冻存的 JM109 高效率感受态细胞从－70℃冰箱中取出，放置在冰浴直至融化（大概 5 分钟），轻轻振动离心管使之混匀。
4. 向步骤 2 准备的每个转化管中加入 50μl 感受态细胞。（加入 100μl 细胞进行转化效率的测定）
5. 轻轻振动小管混匀，冰浴 20 分钟。
6. 在精确的 42℃水浴中热击 45－50 秒（不要振动）。
7. 迅速将管子移到冰浴中，使细胞冷却 2 分钟。
8. 每管连接反应转化细胞中加入平衡至室温的 950μl SOC 培养基，而转化未酶切质粒的细胞加入 900μl SOC 培养基。（可加入 LB 培养基，但得到的克隆菌数目可能会降低。）
9. 在 37℃振荡培养（150rpm）1.5 小时。
10. 将每个转化培养基 100μl 涂到两个 LB/氨苄/IPTG/X-Gal 平板上。对于转化对照，建议涂板时用 SOC 培养基 1：10 稀释。如果期望得到更高的克隆数目，可将细胞用 1000 x g 离心 10 分钟沉淀，然后用 200 μl SOC 培养基重悬后，各取 100μl 涂 2 块板。
11. 将平板于 37℃过夜培养（16－24 小时）。我们的实验经验是：使用 1×10^{8} cfu/μg DNA 的感受态细胞，每个平板涂布 100μl，大约可得到 100 个克隆。长时间孵育或将平板 37℃过夜培养后贮存在 4℃，有助于蓝白斑筛选。白色克隆菌一般包括插入子，然而，蓝色克隆菌也有可能包括插入子，更多信息请参看章节 VI.D。

注意：

1. 实验证明使用大的（17×100mm）聚丙烯管（比如 Facon 公司产品，目录号：2059），可增加转化效率。实验时避免使用可结合 DNA 的管子，因为其大大降低克隆菌数目。
2. 包含β-半乳糖苷酶活性的克隆菌相对于无该酶活性的菌而言，生长比较慢。过夜培养后，一般蓝斑比白斑小，大约 1μm 直径大小。

VI. 注意事项

A. PCR 产物的纯度

连接反应前需用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物。用于连接反应的 PCR 产物可用 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System(d) (Cat.# A9281)进行胶纯化或直接进行 PCR 产物的纯化。 应尽量减少暴露在短波紫外灯的时间以避免嘧啶二聚体的形成。如果电泳检测 PCR 产物条带弥散，或出现非特异条带，则需要切下目的条带，并用 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System 纯化 DNA。即使 PCR 产物电泳检测只有预期大小的明显条带，也应使用 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System 对目的条带进行凝胶纯化或 PCR 产物直接纯化以除去引物二聚体。不经纯化的 PCR 产物在某些条件下可直接用于连接，但由于引物二聚体和 PCR 产物中其它物质的影响，造成含有插入片段的阳性克隆数减少，因而需要筛选很多克隆方可得到含有目的 PCR 产物的阳性克隆。

B. 平端 PCR 产物

具有校正活性的热稳定性 DNA 聚合酶如 Pfu DNA 聚合酶 (产品目录号：M7741)，*Pwo* DNA 聚合酶，*Tli* DNA 聚合酶（目录号 M7101）在进行 PCR 扩增时产生平端 PCR 产物。这种平端 PCR 产物可以通过加 A 尾程序后（图 4），连接到 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体中（6）。采用这种方法连接，只有一个片段插入，而平端连接克隆可能产生多个插入。另外采用 T 载体克隆不需要对载体去磷酸化，载体自连的背景很低。

Pfu 和 *Tli* DNA 聚合酶产生的 PCR 产物经过加尾处理，并以理想载体：插入片段比例进行连接，可得到 55－95％重组子（表 2）。值得注意的是，PCR 产物有必要采用 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System[(d)] (Cat.# A9281)进行 PCR 产物直接纯化或凝胶纯化。若 PCR 产物不进行纯化，*Pfu*、*Pwo* 和 *Tli* DNA 聚合酶的校正活性在进行加尾反应或连接反应时，可降解 PCR 片段的 3’-A 或除去加尾反应的载体的 3’-T 突出端。

为了提高克隆效率，应根据纯化 PCR 产物的摩尔浓度调整加尾反应中的 DNA 量和连接需要的体积。当 PCR 产物片段小或扩增反应良好，产物的摩尔浓度高，加尾或连接反应需要的体积很小。相反，如果 PCR 片段比较大或扩增不好，产物的摩尔浓度低，则需要较大的体积。我们已成功地用 *Taq* DNA 聚合酶 对 1-7μl 纯化的平端 PCR 片段进行加尾反应，并优化插入片段:载体的连接比例，参见章节 IV.C 详细讨论了插入片段:载体比例的优化。转化后采用蓝白斑筛选重组子，结果 70－100％的重组子含有 PCR 扩增的 DNA 片段，而 PCR 片段没有加尾的对照反应，只有很少的重组子。对照实验结果表明大多数 pGEM®-T Easy 载体含有 3’-T，并且 Taq DNA 聚合酶可成功对大多数 PCR 片段加上 3’-A。

表 **2.** 用于不同 **DNA** 聚合酶的加 **A** 尾程序的比较

聚合酶	％重组子[1]			
	24℃连接 **1** 小时（标准方法）		**4**℃连接 **16** 小时（可供选择的方法）	
	542bp	**1.8kb**	**542bp**	**1.8kb**
Pfu DNA 聚合酶	65-84%[2]	31-55%[3]	81-95%[2]	50-75%[3]
Tli DNA 聚合酶	68-77%[4]	37-65%[5]	85-93%[4]	60-81%[5]

将 *Pfu* 和 *Tli* DNA 聚合酶产生的 PCR 产物加 A 尾后和 pGEM®-T Easy 载体进行连接，连接条件是 24℃连接 1 小时或 4℃连接 16 小时。将 2μl 连接反应物转化 JM109 感受态细胞，涂布在 LB/氨苄/IPTG/X-gal 平板上。

[1] ％重组子=白色克隆菌数/白色和蓝色克隆菌数×100％。PCR 产物加 A 尾前经过 Wizard® PCR Preps DNA 纯化系统[(f)]纯化。
[2] 检测的插入片段:载体连接比例为 5:1，3:1，1:1。用于加 A 尾反应的 PCR 扩增产物的体积为 1-2μl。
[3] 检测的插入片段:载体连接比例为 3:1，2:1，1:1。用于加 A 尾反应的 PCR 扩增产物的体积为 3-7μl。
[4] 检测的插入片段:载体连接比例为 3:1，2:1，1:1。用于加 A 尾反应的 PCR 扩增产物的体积为 1-2μl。
[5] 检测的插入片段:载体连接比例为 2:1，1:1。用于加 A 尾反应的 PCR 扩增产物的体积为 4-7μl。

Promega
Precision Design... for Life
www•promega•com

由具有校正活性的 DNA 聚合酶（如 *Pfu* DNA 聚合酶）产生的
PCR 扩增片段的纯化产物 1-7μl

↓

加入 1μl *Taq* DNA 聚合酶 10×反应缓冲液（含 $MgCl_2$）

↓

加入 dATP 至终浓度 0.2mM。

↓

加入 5 单位的 *Taq* DNA 聚合酶

↓

加去离子水至终反应体积为 10μl

↓

70℃孵育 15-30 分钟

↓

采用 1-2μl 用于 Promega 公司 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体连接反应

图 4. 用于 T-载体克隆的平端 PCR 产物经过 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Cat.# A9281) 纯化后加 A 尾实验步骤。

C．优化插入片段和载体的摩尔比

pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体系统优化的插入 DNA 对照片段和载体的摩尔比为 1:1，采用 8:1 到 1:8 的连接比例也可成功进行连接。如果你的 PCR 产物开始的连接不理想，则有必要优化连接比例。一般开始采用 3:1 到 1:3 的连接比例。PCR 产物的浓度可通过凝胶电泳上的 DNA 分子量标准进行估计或采用荧光定量。pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体大概 3kb 大小，系统提供的载体浓度为 50ng/μl。计算连接反应中需要的 PCR 产物的量可采用以下公式。

$$\frac{\text{加入载体的量（ng）}\times\text{插入片段大小（kb）}}{\text{载体大小（kb）]}}\times\text{插入片段和载体的摩尔比}=\text{插入片段的量（ng）}$$

根据推荐的不同插入片段:载体比例加入足够的 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体进行连接，并进行对照反应。

举例说明插入片段和载体比例计算：

注意：对同样的插入片段，若使用插入片段:载体摩尔比为 1:1，需要 0.5kb 的插入片段 8.3ng。

假如插入片段和载体的连接比例为 3:1，如连接反应中加入 3kb 载体 50ng，问 0.5kb PCR 产物需加入多少？

$$\frac{\text{50ng载体}\times\text{0.5kb插入片段}}{\text{3.0kb载体}}\times 3/1 = 25\text{ng 插入片段}$$

D．筛选含插入片段的转化子

插入片段成功克隆到 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体中，可阻断 β 半乳糖苷酶的编码序列，因而重组克隆可在指示培养基上通过颜色进行筛选。然而连接到 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体的 PCR 产物的特点对转化后蓝白斑克隆菌的比例影响很大。大多数情况下含有 PCR 产物的克隆菌为白色，如果 PCR 片段和 LacZ 基因在同一读码框，则重组克隆菌可能为蓝色。这种 DNA 片段碱基数是 3 的整数倍（含 3'-A），并且读码框无终止密码子。据文献报道，在同一读码框内插入长达 2kb 的 DNA 片断，重组克隆菌仍可能为蓝色。

即使 PCR 产物不是 3 的整数倍大小，由于扩增反应可引入突变（缺失或点突变），也可造成 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体和片段连接转化后，重组克隆菌为蓝色。

pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体系统的对照 DNA 为 542bp，来源于 Promega 公司 pGEM®-luc（b,个 g）DNA (Cat.#E1541)，这个 DNA 序列被引入突变，在 6 个读码框中含有多个终止密码子，从而确保对照反应产生的蓝色克隆菌的背景数很低。由此可见，插入 DNA 对照的结果不能代表你的 PCR 产物的连接结果。

E. 实验对照

Promega 公司强烈推荐使用以下对照操作，这些对正确评价 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体系统是必要的。

阳性对照

采用插入 DNA 对照建立连接反应（章节 IV），并按照第Ⅴ部分介绍的方法进行转化。这种对照反应可确定是否能有效连接。一般当感受态细胞转化效率为 1×10^8 cfu/μg DNA，可观察到大约 100 个菌落，其中 10－40％菌落为蓝色，超过 60％为白色。插入的 DNA 对照是经过专门设计的，其插入可产生白斑，然而其它的 DNA 片段插入可能不产生白斑（见章节 VI.D）。阳性对照连接产生的蓝斑背景来自无 T 尾及不完全消化的 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体。这些蓝斑也可看作一个内在的转化对照，如果转化结果没有任何克隆菌，表明是转化本身有问题。如果只得到蓝斑，没有白斑产生，则说明连接反应存在问题。如果阳性对照<50%菌落为白斑，表明连接条件可能不理想。

背景对照

按照第Ⅳ部分 A 方法建立连接反应，反应体系中只加入 50ng pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体，不加入插入片段，并采用第Ⅴ部分介绍的方法进行转化。此对照反应可确定由于无 T 尾及不完全消化的 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体产生的蓝斑背景。如果严格按照第Ⅴ部分的方法进行转化，感受态细胞效率为 1×10^8 cfu/μg DNA，一般可观察到 10－30 个蓝斑背景。（感受态效率为 1×10^7 cfu/μg DNA 时，可观察到 1－3 个 蓝斑；感受态效率 1×10^9 cfu/μg DNA 时，可观察到 100－300 个蓝斑）。采用标准方法连接 PCR 产物，将转化产生的蓝斑数目与背景对照相比，如果其蓝斑数明显高于背景对照，表明这些蓝斑中有重组克隆菌（见章节 VI.D）。

转化对照

采用没有酶切的质粒（不是 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体，因为这两个载体已经线性化）进行转化以检测感受态细胞转化效率并以 cfu/μg DNA 进行计算。如转化效率低于 1×10^8 cfu/μg DNA，则需要重新制备感受态（Promega 公司有感受态细胞，见章节 XII.B.）。如果你不采用 pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体系统Ⅱ（目录号分别是 A3610 和 A1380）中提供的高效率 JM109 感受态细胞，一定要注意使用的感受态细胞适合蓝白斑及氨苄筛选，并且其转化效率至少为 10^8 cfu/μg DNA。

举例说明转化效率的计算：

用 100μl 感受态细胞转化 0.1ng 未酶切的质粒 DNA，转化反应后加入到 900μl SOC 培养基（0.1ng DNA/ml）。然后用 SOC 培养基 1:10 稀释（0.01ng DNA/ml），而后两个平板分别涂布 100μl（0.001ng DNA/ml）。如果产生 200 个菌落（两个平板菌落的平均数），转化效率是多少？

$$200\ \text{cfu}/0.001\text{ng} = 2\times10^5\text{cfu/ng} = 2\times10^8\ \text{cfu}/\mu\text{g}$$

VII. 重组质粒 DNA 的提取

Promega 公司操作及应用指南（8）介绍的质粒小量提取步骤需要进行 30－60 分钟，。这种质粒小量提取费时费力，特别是进行很多质粒的小量提取时。Wizard® Plus SV 小量 DNA 纯化系统(h, i) (Cat.# A1330)是一种方便和可信赖的方法。

VIII. pGEM®-T 和 pGEM®-T Easy 载体单链 DNA 的制备

为诱导单链DNA的产生，含有pGEM®-T或pGEM®-T Easy 载体的细菌细胞需要用适当的辅助噬菌体感染（例如R408辅助噬菌体，产品目录号：P2291）。质粒进入f1复制模式，产生的单链DNA以包装病毒颗粒的形式输出。上清液经过简单的沉淀及抽提步骤即可纯化单链DNA，详细过程参见操作及应用指南（目录号＃P1610）。如需更多的信息，请联系附近的Promega公司办事处或代理商。在美国可联系技术热线1－800－356－9526。

IX. 疑难解答

问题	可能的原因	建议
无转化克隆菌产生	转化有问题或感受态细胞没有活力。	不管有没有插入 DNA，因未酶切或无 T 尾载体自连产生的背景应有 10－30 个蓝色菌落。建议检测背景对照（见章节 VI. E） 应用高效率感受态细胞（≥1×10^8 cfu/μg DNA）。通过转化如 pGEM®-5Zf(+)等未切割的可用于抗性筛选的质粒，检测感受态细胞的转化效率。按照第 V 部分 A 的方法，使用 1×10^8 cfu/μg DNA 感受态细胞可产生 100 个克隆菌，若使用 1×10^7 cfu/μg DNA 感受态细胞，则可能观察不到克隆菌（见章节 VI. E）。
插入 DNA 对照产生不到 10％白色菌落	2×快速连接缓冲液稀释不当	提供的 T_4 连接酶缓冲液为二倍浓度，10μl 反应体积加 5μl T_4 连接酶缓冲液。
	连接反应存在问题	连接缓冲液只有低的活性。2×快速连接缓冲液含有 ATP，温度波动 ATP 易降解。使用一次性分装的缓冲液，避免其反复冻化。
		用大约 20ng DNA 分子量标准（如 Lambda DNA/Hind III 分子量标准，Cat.# G1711）建立一个连接反应以检测连接酶及缓冲液的活力。在凝胶上比较连接的和未连接的 DNA 片段并检查分子量标准 DNA 片段是否被连接成高分子量的片段。
	T 突出端丢失，引起载体平端连接，因而蓝色菌落数高于白色菌落数。	避免核酸外切酶的引入，降解 T 突出端。只使用系统自己提供的 T_4 连接酶，这种连接酶外切酶活力最低。
连接转化时产生大量的克隆菌，但和插入 DNA 对照相比，白色菌落的比例低。	使用的感受态细胞的转化效率很高（≥1×10^9 cfu/μg DNA），连接反应存在问题。	如果使用 1×10^9 cfu/μg DNA 的感受态细胞，用试剂盒中的阳性对照进行连接实验，大概可得到 1000 个克隆，其中 70－90％应为白色菌落。如连接反应没有优化或失败，虽然转化的总克隆菌数很高（≥1×10^9 cfu/μg DNA 感受态细胞可获得高至 300 个菌落），但白色菌落很少或没有。参见以上“连接反应失败”中的建议对策。

Promega
Precision Design… for Life
www•promega•com

对于没有表述的问题，请联系当地的 Promega 公司分支机构和代理商（联系方式可查看网站 www.promega.com） E-mail：techserv@promega.com

现象	可能原因	评论
采用插入 DNA 对照连接转化时白色克隆菌数低于 60%。	2×快速连接缓冲液稀释不当。	提供的 T_4 连接酶缓冲液为二倍浓度，10 μl 反应体积加 5 μl T_4 连接酶缓冲液。
	T 突出端丢失，引起载体平端连接，因而蓝色菌落数高于白色菌落数。	避免核酸外切酶的引入，降解 T 突出端。只使用系统自己提供的 T_4 连接酶，这种连接酶外切酶活力最低。
	连接温度太高。	连接温度过高（>28℃）可增加背景，重组克隆菌减少。
PCR 产物连接时白色菌落数很少或根本没有。	2×快速连接缓冲液稀释不当。	提供的 T_4 连接酶缓冲液为二倍浓度，10 μl 反应体积加 5 μl T_4 连接酶缓冲液。
	连接孵育时间不够长。	连接过夜可得到理想结果。
	PCR 产物中含有抑制连接的成分，导致连接失败。	将 PCR 产物和连接反应对照混合，观察是否存在抑制效应。如怀疑有抑制成分存在，应重新纯化 PCR 产物。
	PCR 产物不能连接，因为其没有 3’-A 突出端。	如表 1 所述，并非所有 DNA 聚合酶都产生 3’-A 突出端（3，4）。平端 PCR 产物可采用适当的聚合酶及 dATP 进行加尾反应产生 3’-A 突出端。
	由于紫外灯过度照射形成嘧啶二聚体，PCR 产物不能连接。	凝胶纯化的 DNA 常出现这样的问题，没有任何办法可以解决，DNA 需重新制备。注意暴露在紫外灯下的时间应尽量缩短。在凝胶和紫外灯之间使用玻璃板可降低紫外灯的过度照射。如果可能，尽量使用长波长紫外光源观察 PCR 产物。
	PCR 产物已经插入，但未破坏 *lacZ* 基因。	如果和背景对照相比有很多蓝色菌落，这些蓝色菌落可能含有插入片段。蓝色和白色菌落均可用于筛选（参见章节 VI.C）
	插入片段：载体连接比例不理想。	凝胶电泳检测 PCR 产物的完整性及浓度，优化插入片段：载体比例（参见章节 VI.C）。
	连接的 PCR 片段中可能有引物二聚体。	引物二聚体可连接到 pGEM®-T 或 pGEM®-T Easy 载体中，因为它们很小，所以酶切消化后电泳检测看不到带，看起来载体中没有插入。和背景对照相比，连接产生较多蓝色克隆。PCR 产物需要重新凝胶纯化。
	PCR 反应扩增的多种产物克隆到 pGEM®-T 或 pGEM®-T Easy 载体中。	凝胶纯化目的条带。
	DNA 重排。	检测大量克隆观察重排是否是随机的。如果是随机重排，通过筛选可得到有目的 DNA 片段的克隆菌，而如果所有克隆是一种重排方式，则需要使用修补缺陷的菌株保护插入片段，减少重排事件的发生。

PCR 连接反应只产生白色克隆（没有蓝色克隆）。	氨苄失活，因而氨苄敏感菌可生长。	检查氨苄平板是正常制备并在一个月内使用。
	菌株（如 JM109）丧失 F' 因子。	检测背景对照，如果菌落不是蓝色的，则可能是宿主菌细胞丢失 F'因子（假设 $lacI_qZ\Delta M15$ 位于宿主菌的 F'因子上，并使用正常平板）。用于 T-载体系统的感受态细胞一定要正确制备。（参看章节Ⅴ）。
	平板不适合蓝白斑筛选。	检测背景对照，如果克隆菌不是蓝色的，检查平板是否含有氨苄/IPTG/X-Gal 以及是否新鲜。如平板有问题，重新制备新鲜平板。
含有目的 PCR 产物的克隆菌数不够。	PCR 片段很多没有 A 尾。	将 PCR 产物纯化后进行加尾反应（9，10）。样品纯化后进行连接反应。
	插入片段：载体比例不理想。	凝胶电泳检测 PCR 产物的完整性及产量，优化插入片段：载体比例（参见章节 VI.C）。
	多个 PCR 产物被克隆进 pGEM®-T 或 pGEM®-T Easy 载体	凝胶纯化目的 PCR 产物。

X. 参考文献

1. Mezei, L.M. and Storts, D.R. (1994) Purification of PCR products. In: PCR Technology: Current Innovations, Griffin, H.G. and Griffin, A.M., eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 21.
2. Robles, J. and Doers, M. (1994) pGEM® -T Vector Systems troubleshooting guide. Promega Notes **45**, 19.
3. Clark, J.M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eucaryotic DNA polymerases. Nucl. Acids Res. **16**, 9677.
4. Newton, C.R. and Graham, A. (1994) In: PCR, BIOSScientific Publishers, Ltd., Oxford, UK, 13.
5. Knoche, K. and Kephart, D. (1999) Cloning blunt-end PfuDNA Polymerase-generated PCR fragments into pGEM®-T Vector Systems. Promega Notes **71**, 10.
6. Haff, L. and Mezei, L. (1989) Amplifications**1**, 8.
7. Messing, J. et al. (1981) A system for shotgun DNA sequencing. Nucl. Acids Res. **9**, 309.
8. Protocols and Applications Guide, Third Edition (1996) Promega Corporation.
9. Kobs, G. (1995) pGEM®-T Vector: cloning of modified blunt-ended DNA fragments. Promega Notes **55**, 28.

Zhou, M.-Y., Clark, S.E. and Gomez-Sanchez, C.E. (1995) Universal cloning method by TA strategy. BioTechniques **19**, 34.

Promega
Precision Design… for Life
www•promega•com

XI. 附录 A：载体序列及限制性酶切位点

A. pGEM®-T 载体序列

下面列出的序列是环状载体 pGEM®-5Zf(+)的序列。pGEM®-T 载体是通过在该序列 51 位(星号指示的地方)采用 EcoRV 酶切线性化并在两个 3'末端添加 T 形成的。添加的 T 没有包括在这个序列中。显示的序列和 T7 RNA Polymerase 合成的 RNA 序列是一致的，而和 SP6 RNA Polymerase 合成的 RNA 序列是互补的。显示的这条链和载体产生的单链 DNA 是互补的。载体的序列也可在网站www.promega.com/vectors/上查询。

1 GGGCGAATTG GGCCCGACGT CGCATGCTCC CGGCCGCCAT GGCCGCGGGA
51 T*ATCACTAGT GCGGCCGCCT GCAGGTCGAC CATATGGGAG AGCTCCCAAC
101 GCGTTGGATG CATAGCTTGA GTATTCTATA GTGTCACCTA AATAGCTTGG
151 CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCCTGTGT GAAATTGTTA TCCGCTCACA
201 ATTCCACACA ACATACGAGC CGGAAGCATA AAGTGTAAAG CCTGGGGTGC
251 CTAATGAGTG AGCTAACTCA CATTAATTGC GTTGCGCTCA CTGCCCGCTT
301 TCCAGTCGGG AAACCTGTCG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT CGGCCAACGC
351 GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG TATTGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC
401 TGACTCGCTG CGCTCGGTCG TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT
451 CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG
501 AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC
551 GTTGCTGGCG TTTTTCCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAAA
601 ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC
651 CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT
701 GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC
751 TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTCGC
801 TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC
851 CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT
901 CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA
951 GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG
1001 AAGAACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA
1051 AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT
1101 GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA
1151 AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA
1201 ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC
1251 TAGATCCTTT TAAATTAAAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA
1301 TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA
1351 TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC
1401 GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC
1451 AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA
1501 ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC
1551 GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC
1601 GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG
1651 TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA
1701 TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC
1751 CTTCGGTCCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC
1801 TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TTACTGTCAT GCCATCCGTA
1851 AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA
1901 GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GGCGTCAATA CGGGATAATA
1951 CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT
2001 TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT
2051 GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA
2101 GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA
2151 ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTTCAATA
2201 TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG
2251 AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA
2301 AAAGTGCCAC CTGATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC GTAAGGAGAA
2351 AATACCGCAT CAGGAAATTG TAAGCGTTAA TATTTTGTTA AAATTCGCGT
2401 TAAATTTTTG TTAAATCAGC TCATTTTTTA ACCAATAGGC CGAAATCGGC
2451 AAAATCCCTT ATAAATCAAA AGAATAGACC GAGATAGGGT TGAGTGTTGT
2501 TCCAGTTTGG AACAAGAGTC CACTATTAAA GAACGTGGAC TCCAACGTCA
2551 AAGGGCGAAA AACCGTCTAT CAGGGCGATG GCCCACTACG TGAACCATCA
2601 CCCTAATCAA GTTTTTTGGG GTCGAGGTGC CGTAAAGCAC TAAATCGGAA

2651 CCCTAAAGGG AGCCCCCGAT TTAGAGCTTG ACGGGGAAAG CCGGCGAACG
2701 TGGCGAGAAA GGAAGGGAAG AAAGCGAAAG GAGCGGGCGC TAGGGCGCTG
2751 GCAAGTGTAG CGGTCACGCT GCGCGTAACC ACCACACCCG CCGCGCTTAA
2801 TGCGCCGCTA CAGGGCGCGT CCATTCGCCA TTCAGGCTGC GCAACTGTTG
2851 GGAAGGGCGA TCGGTGCGGG CCTCTTCGCT ATTACGCCAG CTGGCGAAAG
2901 GGGGATGTGC TGCAAGGCGA TTAAGTTGGG TAACGCCAGG GTTTTCCCAG
2951 TCACGACGTT GTAAAACGAC GGCCAGTGAA TTGTAATACG ACTCACTATA

Promega
Precision Design... *for Life*
www•promega•com

B. pGEM®-T 载体限制性酶切位点

下列限制性酶切位点图表是基于环状载体 pGEM®-5Zf(+)的序列。pGEM®-T 载体是通过在 51 位碱基采用 EcoRV 酶切线性化并在两个 3'末端添加 T 形成的。这个酶切位点在载体和插入片段连接后不再存在。这个表格是通过 DNASTAR®序列分析软件产生的。请注意我们没有用每一个酶进行消化来验证这个结果，给出的位点是酶切 DNA 的 3'末端的位置（酶切位点左侧的碱基）。如你发现有不确切的地方，请联系当地的 Promega 分支机构和代理商。

表 **3.** 在 pGEM®-T 载体上有 1－5 个切点的限制性内切酶。

Enzyme	# of Sites	Location
***Aat* II**	1	20
***Acc* I**	1	76
***Acy* I**	2	17, 1932
Afl III	2	99, 502
***Alw*26 I**	2	1456, 2232
***Alw*44 I**	2	816, 2062
*Alw*N I	1	918
***Apa* I**	1	14
*Asp*H I	4	94, 820, 1981, 2066
***Ava* II**	2	1533, 1755
***Ban* I**	3	246, 1343, 2626
***Ban* II**	3	14, 94, 2664
***Bbu* I**	1	26
***Bgl* I**	3	39, 1515, 2833
Bsa I	1	1456
*Bsa*A I	1	2589
*Bsa*H I	2	17, 1932
*Bsa*J I	5	37, 43, 241, 662, 2936
*Bsp*120 I	1	10
*Bsp*H I	2	1222, 2230
*Bsp*M I	1	62
*Bss*S I	2	675, 2059
***Bst*O I**	5	242, 530, 651, 664, 2937
***Bst*X I**	1	103
***Nae* I**	1	2692
***Nci* I**	4	30, 882, 1578, 1929
***Nco* I**	1	37
***Nde* I**	1	82
***Ngo*M IV**	1	2690
***Not* I**	1	62
***Nsi* I**	1	112
Nsp I	2	26, 506
*Pae*R7 I	1	2621
*Ppu*10 I	1	108
***Pst* I**	1	73
***Pvu* I**	2	1765, 2861
***Pvu* II**	2	326, 2890
***Rsa* I**	1	1875
***Sac* I**	1	94
***Bst*Z I**	2	31, 62
*Cfr*10 I	2	1475, 2690
***Dde* I**	4	777, 1186, 1352, 1892
***Dra* I**	3	1261, 1280, 1972
Dra III	1	2589
Drd I	2	610, 2544
Dsa I	2	37, 43
Eag I	2	31, 62
Ear I	3	386, 2190, 2878
***Ecl*HK I**	1	1395
***Eco*52 I**	2	31, 62
***Eco*ICR I**	1	92
***Eco*R V**	1	51 (see above)
***Fok* I**	5	119, 1361, 1542, 1829, 2919
Fsp I	2	1617, 2840
***Hae* II**	4	380, 750, 2740, 2748
Hga I	4	613, 1191, 1921, 2806
***Hinc* II**	1	77
Hind II	1	77
***Hsp*92 I**	2	17, 1932
Mae I	5	56, 997, 1250, 1585, 2740
***Mlu* I**	1	99
***Sac* II**	1	46
***Sal* I**	1	75
***Sca* I**	1	1875
***Sfi* I**	1	39
***Sin* I**	2	1533, 1755
***Spe* I**	1	55
***Sph* I**	1	26
*Sse*8387 I	1	73
***Ssp* I**	2	2199, 2381
***Sty* I**	1	37
***Taq* I**	4	76, 602, 2046, 2622
Tfi I	2	337, 477
***Vsp* I**	3	273, 332, 1567
***Xmn* I**	1	1994

注意：粗体字所列的酶可从 Promega 购买

表 4. 不能切割 pGEM®-T 载体的限制性内切酶

AccB7 I	Bbs I	**Bst98 I**	Ehe I	PinA I	Spl I
Acc III	**Bcl I**	**BstE II**	Fse I	Pme I	Srf I
Acc65 I	**Bgl II**	**Bsu36 I**	**Hind III**	Pml I	**Stu I**
Afl II	Blp I	**Cla I**	**Hpa I**	PpuM I	Swa I
Age I	Bpu1102 I	**Csp I**	**I-Ppo I**	PshA I	**Tth111 I**
Asc I	BsaB I	**Csp45 I**	Kas I	Psp5 II	**Xba I**
Ava I	**BsaM I**	Dra II	**Kpn I**	PspA I	Xcm I
Avr II	Bsm I	**Eco47 III**	**Nar I**	Rsr II	**Xho I**
Bal I	**BsrBR I**	Eco72 I	**Nhe I**	**Sgf I**(k)	**Xma I**
BamH I	BsrG I	Eco81 I	**Nru I**	SgrA I	
Bbe I	**BssH II**	EcoN I	Pac I	**Sma I**	
BbrP I	Bst1107 I	**EcoR I**	PflM I	**SnaB I**	

注意：粗体字所列的酶可从 Promega 公司购买

表 5. 切割 pGEM®-T 载体 6 次以上的限制性内切酶

Aci I	**Bst71 I**	**Hae III**	Mae III	**Nde II**	SfaN I
Alu I	BstU I	**Hha I**	**Mbo I**	Nla III	**Tru9 I**
Bbv I	**Cfo I**	**Hinf I**	**Mbo II**	Nla IV	**Xho II**
BsaO I	**Dpn I**	**Hpa II**	Mnl I	Ple I	
Bsp1286 I	Dpn II	Hph I	Mse I	**Sau3A I**	
Bsr I	Eae I	**Hsp92 II**	**Msp I**	**Sau96 I**	
BsrS I	Fnu4H I	Mae II	**MspA1 I**	ScrF I	

注意：粗体字所列的酶可从 Promega 公司购买

C. pGEM®-T Easy 载体序列

pGEM®-T Easy 载体是通过在该序列 60 位(星号指示的地方)采用 EcoRV 酶切线性化并在两个 3'末端添加 T 形成的。添加的 T 没有包括在这个序列中。显示的序列和 T7 RNA Polymerase 合成的 RNA 序列是一致的，而和 SP6 RNA Polymerase 合成的 RNA 序列是互补的。显示的这条链和载体产生的单链 DNA 是互补的。载体的序列也可在网站www.promega.com/vectors/上查询。

1 GGGCGAATTG GGCCCGACGT CGCATGCTCC CGGCCGCCAT GGCGGCCGCG
51 GGAATTCGAT* ATCACTAGTG AATTCGCGGC CGCCTGCAGG TCGACCATAT
101 GGGAGAGCTC CCAACGCGTT GGATGCATAG CTTGAGTATT CTATAGTGTC
151 ACCTAAATAG CTTGGCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT
201 TGTTATCCGC TCACAATTCC ACACAACATA CGAGCCGGAA GCATAAAGTG
251 TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTGCGTTGC
301 GCTCACTGCC CGCTTTCCAG TCGGGAAACC TGTCGTGCCA GCTGCATTAA
351 TGAATCGGCC AACGCGCGGG GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GGCGCTCTTC
401 CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTCGTTCGG CTGCGGCGAG
451 CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTTATCCAC AGAATCAGGG
501 GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA
551 CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCCTG
601 ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA
651 GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC
701 TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT
751 CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG
801 GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA
851 GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAACTA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG
901 TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC
951 AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA
1001 CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC
1051 CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC
1101 ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTTTGC AAGCAGCAGA TTACGCGCAG
1151 AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG
1201 CTCAGTGGAA CGAAAACTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA

1251 AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC
1301 AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACTTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA
1351 TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTCGTTC ATCCATAGTT
1401 GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC
1451 TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG
1501 ATTTATCAGC AATAAACCAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT
1551 CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC
1601 TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCATTG
1651 CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTCAGC
1701 TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA
1751 AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG
1801 CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT
1851 GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA
1901 GTCATTCTGA GAATAGTGTA TGCGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT
1951 CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAAA AGTGCTCATC
2001 ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAACTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT
2051 GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT
2101 CTTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT
2151 GCCGCAAAAA AGGGAATAAG GGCGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT
2201 CTTCCTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA
2251 GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG
2301 CGCACATTTC CCCGAAAAGT GCCACCTGAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA
2351 GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGA AATTGTAAGC GTTAATATTT
2401 TGTTAAAATT CGCGTTAAAT TTTTGTTAAA TCAGCTCATT TTTTAACCAA
2451 TAGGCCGAAA TCGGCAAAAT CCCTTATAAA TCAAAAGAAT AGACCGAGAT
2501 AGGGTTGAGT GTTGTTCCAG TTTGGAACAA GAGTCCACTA TTAAAGAACG
2551 TGGACTCCAA CGTCAAAGGG CGAAAAACCG TCTATCAGGG CGATGGCCCA
2601 CTACGTGAAC CATCACCCTA ATCAAGTTTT TTGGGGTCGA GGTGCCGTAA
2651 AGCACTAAAT CGGAACCCTA AAGGGAGCCC CCGATTTAGA GCTTGACGGG
2701 GAAAGCCGGC GAACGTGGCG AGAAAGGAAG GGAAGAAAGC GAAAGGAGCG
2751 GGCGCTAGGG CGCTGGCAAG TGTAGCGGTC ACGCTGCGCG TAACCACCAC
2801 ACCCGCCGCG CTTAATGCGC CGCTACAGGG CGCGTCCATT CGCCATTCAG
2851 GCTGCGCAAC TGTTGGGAAG GGCGATCGGT GCGGGCCTCT TCGCTATTAC
2901 GCCAGCTGGC GAAAGGGGGA TGTGCTGCAA GGCGATTAAG TTGGGTAACG
2951 CCAGGGTTTT CCCAGTCACG ACGTTGTAAA ACGACGGCCA GTGAATTGTA
3001 ATACGACTCA CTATA

D. pGEM®-T Easy 载体限制性酶切位点

pGEM®-T Easy 载体是通过在 60 位碱基采用 EcoRV 酶切线性化并在两个 3’末端添加 T 形成的。这个酶切位点在载体和插入片段连接后不再存在。这个表格是通过 DNASTAR®序列分析软件产生的。请注意我们没有用每一个酶进行消化来验证这个结果，给出的位点是酶切 DNA 的 3’末端的位置（酶切位点左侧的碱基）。如你发现有不确切的地方，请联系当地的 Promega 分支机构和代理商。在美国可拨打技术服务热线 1-800-356-9526。

表 6. 切割 pGEM®-T Easy 载体 1 至 5 次的限制性内切酶

Enzyme	# of Sites	Location
Aat II	1	20
Acc I	1	91
Acy I	2	17, 1947
Afl III	2	114, 517
Alw26 I	2	1471, 2247
Alw44 I	2	831, 2077
AlwN I	1	933
Apa I	1	14
AspH I	4	109, 835, 1996, 2081
Ava II	2	1548, 1770
Ban I	3	261, 1358, 2641
Ban II	3	14, 109, 2679
Bbu I	1	26
Bgl I	4	39, 42, 1530, 2848
Bsa I	1	1471
BsaA I	1	2604
BsaH I	2	17, 1947
BsaJ I	5	37, 46, 256, 677, 2951
Bsp120 I	1	10
BspH I	2	1237, 2245
BspM I	1	77
BssS I	2	690, 2074
BstO I	5	257, 545, 666, 679, 2952
BstX I	1	118
BstZ I	3	31, 43, 77
Cfr10 I	2	1490, 2705
Dde I	4	792, 1201, 1367, 1907
Dra I	3	1276, 1295, 1987
Dra III	1	2604
Drd I	2	625, 2559
Dsa I	2	37, 46
Eag I	3	31, 43, 77
Ear I	3	401, 2205, 2893
EclHK I	1	1410
Eco52 I	3	31, 43, 77
EcoICR I	1	107
EcoR I	2	52, 70
EcoR V	1	60 (see above)
Fok I	5	134, 1376, 1557, 1844, 2931

Enzyme	# of Sites	Location
Fsp I	2	1632, 2855
Hae II	4	395, 765, 2755, 2763
Hga I	4	628, 1206, 1936, 2821
Hinc II	1	92
Hind II	1	92
Hsp92 I	2	17, 1947
Mae I	5	65, 1012, 1265, 1600, 2755
Mlu I	1	114
Nae I	1	2707
Nci I	4	30, 897, 1593, 1944
Nco I	1	37
Nde I	1	97
NgoM IV	1	2705
Not I	2	43, 77
Nsi I	1	127
Nsp I	2	26, 521
PaeR7 I	1	2636
Ppu10 I	1	123
Pst I	1	88
Pvu I	2	1780, 2876
Pvu II	2	341, 2905
Rsa I	1	1890
Sac I	1	109
Sac II	1	49
Sal I	1	90
Sca I	1	1890
Sin I	2	1548, 1770
Spe I	1	64
Sph I	1	26
Sse8387 I	1	88
Ssp I	2	2214, 2396
Sty I	1	37
Taq I	5	56, 91, 617, 2061, 2637
Tfi I	2	352, 492
Vsp I	3	288, 347, 1582
Xmn I	1	2009

注意：粗体字所列的酶可从 Promega 公司购买

表 7. 不能切割 pGEM®-T Easy 载体的限制性内切酶

Acc B7 I	Bbs I	**Bst98 I**	Fse I	Pme I	Spl I
Acc III	**Bcl I**	**BstE II**	**Hind III**	Pml I	Srf I
Acc65 I	**Bgl II**	**Bsu36 I**	**Hpa I**	PpuM I	**Stu I**
Afl II	Blp I	**Cla I**	**I-Ppo I**	PshA I	Swa I
Age I	Bpu 1102I	**Csp I**	Kas I	Psp5 II	**Tth111 I**
Asc I	BsaB I	**Csp45 I**	**Kpn I**	PspA I	**Xba I**
Ava I	**BsaM I**	Dra II	**Nar I**	Rsr II	Xcm I
Avr II	Bsm I	**Eco47 III**	**Nhe I**	**Sfi I**	**Xho I**
Bal I	**Bsr BR I**	Eco72 I	**Nru I**	**Sgf I**(k)	**Xma I**
BamH I	BsrG I	Eco81 I	Pac I	SgrA I	
Bbe I	**BssH II**	EcoN I	PflM I	**Sma I**	
BbrP I	Bst1107 I	Ehe I	PinA I	**SnaB I**	

注意：粗体字所列的酶可从 Promega 公司购买

表 8. 切割 pGEM®-T Easy 载体 6 次以上的限制性内切酶

Aci I	***Bst*71 I**	***Hae* III**	***Mbo* I**	*Nla* III	***Tru*9 I**
***Alu* I**	*Bst*U I	***Hinf* I**	***Mbo* II**	*Nla* IV	***Xho* II**
Bbv I	***Cfo* I**	***Hpa* II**	*Mnl* I	*Ple* I	
***Bsa*O I**	***Dpn* I**	*Hph* I	*Mse* I	***Sau*3A I**	
***Bsp*1286 I**	*Dpn* II	***Hsp*92 II**	***Msp* I**	***Sau*96 I**	
Bsr I	*Eae* I	*Mae* II	***Msp*A1 I**	*Scr*F I	
***BsrS* I**	*Fnu*4H I	*Mae* III	***Nde* II**	*Sfa*N I	

注意：粗体字所列的酶可从 Promega 公司购买

Promega
Precision Design… *for Life*
www•promega•com

XII. 附录 B：参考资料

A. 缓冲液及溶液配方

IPTG 母液（0.1M）

1.2g IPTG (目录号＃V3951)

补加水至终体积 50ml，过滤灭菌并贮存在 4℃。

X-Gal (2ml)

100mg 5－溴－4－氯－3－吲哚－β－D－半乳糖苷（产品目录号：V3941）溶于 2 ml 二甲基甲酰胺。用铝箔封裹并贮存在－20℃。

LB 培养基 （每升）

10g Bacto® 胰蛋白胨
5g Bacto® 酵母抽提物
5g NaCl

用 NaOH 调节 pH 至 7.0。

含氨苄的 LB 平板

加 15 克琼脂粉到 1 升 LB 培养基中。高压灭菌。当培养基温度降至 50℃时，加入氨苄至终浓度 100μg/ml。85mm 直径的培养皿约需 30－35ml 培养基。培养基完全凝结后，贮存在 4℃可使用 1 个月或贮存在室温可使用 1 个星期。

含氨苄/IPTG/X-Gal 的 LB 平板

按以上程序制备氨苄平板时，补加 IPTG 和 X－gal 至终浓度为 0.5mM IPTG 和 80μg/ml X－gal，而后倒出培养基铺制平板。另一种方法是在使用前将 100μl 的 100mM IPTG 和 20μl 的 50mg/ml X－gal 涂到氨苄平板的表面上，并在 37℃孵育 30 分钟使之吸收后使用。

SOC 培养基（100ml）

2.0g Bacto® 胰蛋白胨
0.5g Bacto® 酵母抽提物
1ml 1M NaCl
0.25ml 1M KCl
1ml 2M Mg^{2+}母液，过滤灭菌（按下法配制）
1ml 2M 葡萄糖，过滤灭菌

将 Bacto® 胰蛋白胨、Bacto® 酵母抽提物、NaCl 及 KCl 加到 97ml 的去离子水中，搅拌使之溶解。高压灭菌并冷却到室温。加入 2M Mg^{2+}母液和 2M 葡萄糖至终浓度 20mM。补加消毒蒸馏水至 100ml。完全培养基用 0.2μm 的滤膜过滤灭菌。最终 pH 值为 7.0。

2M Mg^{2+}母液

20.33g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
24.65g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

加蒸馏水至 100ml，过滤灭菌。

2×快速连接缓冲液，T_4 DNA 连接酶（试剂盒提供）

60mM Tris-HCl (pH7.8)
20mM $MgCl_2$
20mM DTT
2mM ATP
10% 聚乙烯乙二醇（MW8000，ACS 级）

分装为一次用量小管贮存在－20℃。避免反复冻融。

TYP 肉汤（1 升）

16g Bacto® 胰蛋白胨
16g Bacto® 酵母抽提物
5g NaCl
2.5g K_2HPO_4

Promega
Precision Design... for Life
www•promega•com

B. 相关产品

PCR 克隆系统

产品	包装	目录号
PTARGE-T™ Mammalian Expression Vector System[a, l]	20 个反应	A1410

直接用 T 载体进行哺乳动物细胞表达

产品	包装	目录号
PinPoint™ Xa-1 T-Vector System [a, b, m]	20 个反应	V2610
PinPoint™ Xa-1 T-Vector System II with Competent Cell[a, b, m]	20 个反应	V2850

直接用 T 载体进行细菌表达

热稳定性酶

产品	包装	目录号
PCR Master Mix[n, o]	100 个反应	M7501
	1000 个反应	M7502

预先混合包含 *Taq* DNA Polymerase, dNTPs，反应缓冲液和镁离子的 2x 溶液，然后很简单地加入模板和引物。仅供实验试室使用。

产品	包装	目录号
GoTaq™ DNA Polymerase [e, o]	100u	M3001
	500u	M3005
Taq DNA Polymerase [e]	100u	M1661
	500u	M1665
Pfu DNA Polymerase [e]（中国市场没有销售）	100u	M7741
	500u	M7745
Tli DNA Polymerase	50u	M7101

仅供实验试室使用。

RT-PCR 系统

产品	包装	目录号
Access RT-PCR System[n]	20 个反应	A1260
	100 个反应	A1250
	500 个反应	A1280
AccessQuick™ RT-PCR System [n, p]	100 个反应	A1702
	500 个反应	A1703
	20 个反应	A1701
Improm-II™ Reverse Transcription System	100 个反应	A3800

仅供实验试室使用。

PCR 产物纯化系统

产品	包装	目录号
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System[d]	50 个反应	A9281
	250 个反应	A9282

仅供实验试室使用。

产品	包装	目录号
Wizard® SV 96 PCR Clean-Up System	4x96 个反应	A9341
	8x96 个反应	A9342
	1x96 个反应	A9340
Wizard® MagneSil™ PCR Clean-Up System(q)	8x96 个反应	A1931
	100x96 个反应	A1935
	4x96 个反应	A1930

仅供实验试室使用。

dNTPs

产品	包装	目录号
PCR Nucleotide Mix, （每种组分浓度为 10mM）	200µl	C1141
	1000µl	C1145
dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 每种组分浓度为100mM	每种 10µmoles	U1330
dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 每种组分浓度为100mM	每种 40µmoles	U1240
dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 每种组分浓度为100mM	每种 200µmoles	U1410

测序引物

产品	包装	目录号
SP6 Promoter Primer	2µg	Q5011
T7 Promoter Primer	2µg	Q5021
pUC/M13 Primer, Forward (24mer)	2µg	Q5601
pUC/M13 Primer, Reverse (22mer)	2µg	Q5421